

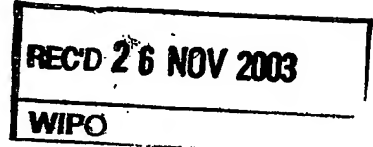
PCT/TR 03/00082
TR 03/00082
#2

T. C.
TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

RÜÇHAN HAKKI BELGESİ

(PRIORITY DOCUMENT)

No: a 2002 02252



Bu belge içerisindeki başvurunun Türk Patent Enstitüsü'ne yapılan Patent başvurusunun tam bir sureti olduğu onaylanır.

(It is hereby certified that annexed hereto is a true copy of the application no 2002/02252 for a patent)

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



T.C.

(19) TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

(21) Başvuru No.
a 2002/02252

(22) Başvuru Tarihi
2002/09/26

(51) Buluşun tasnif sınıf(lar)ı

C12N 15/10

C12P 19/34

C12Q 1/68

(74) Vekil

PINAR BULUT (FARMA PATENT DANIŞMANLIK)
GMK. Bulvarı No: 42/5 Leventler Apt. Kat:3 Maltepe/
ANKARA

(71) Patent Sahipleri

ORHAN KAYA KÖKSALAN

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Tüberküloz Moleküler Epidemiyol

TANIL KOCAGÖZ

Diomed A. Ş. ARGE Bölümü Başkanı Sanayi Cad. No:19 Yukarı Dudullu İstanbul TR

(72) Buluşu Yapanlar

ORHAN KAYA KÖKSALAN
İ. Ü. DETAE Tüberküloz Moleküler Epidemiyolojisi Birimi
Vakıf Gureba C. Çapa İstanbul TR

TANIL KOCAGÖZ

Diomed A.Ş. ARGE Böl. Başkanı Sanayi Caddesi No:19
Yukarıdudullu İstanbul TR

(54) Buluş Başlığı

Mikobakteri türü saptanması için molekül boyu belirleyicileri

(57) Özet

Buluş, mikrobakteri türlerinin saptanmasında kullanılan hsp65 PCR-REA moleküler tür saptama yönteminin elektroforez aşamasında DNA parçalarının boylarının doğru ve kolay ölçülmesini sağlayan molekül boyu belirleyicileri ile ilgilidir.

TARİFNAME

Mikobakteri Türü Saptanması için Molekül Boyu Belirleyicileri

Buluşun ilgili olduğu teknik alan: Başta *Mycobacterium tuberculosis* olmak üzere çeşitli mikobakteri türleri insanlarda enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Farklı türlerle ortaya çıkan enfeksiyonların tedavilerinde kullanılan ilaç türleri çok değişkenlik gösterebilmektedir. Bu nedenle hastalardan alınan klinik örneklerden elde edilen mikobakterilerin tiplendirilmesi büyük önem taşımaktadır. Mikroorganizmaların birçoğu kültürde 3 ila 8 hafta gibi uzun sürelerde üredikleri için, kültüre dayalı pigment oluşturma ve biyokimyasal özelliklere dayalı klasik tiplendirme yöntemleri de hem uzun süre almakta hem de kesin sonuç vermemektedir. Son yıllarda birkaç gün içerisinde sonuç veren çeşitli moleküler tür saptama yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan hsp65 geninin 441 bazçiftlik bir bölümünün polimeraz zincirleme tepkimesi ile çoğaltılması ve BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesilerek incelemesine dayanan yöntem, hızlı, ucuz ve kolay olması nedeniyle giderek daha yaygın kullanıma girmektedir. Bu yöntemin zayıf noktalarından biri, restriksiyon enzimleri ile kesilmiş çoğaltma ürünlerinin elektroforez ile ayrıştırılarak incelenmesi sırasında elde edilen DNA parçalarının boylarının ölçülmesini sağlayan uygun bir molekül boyu belirleyicisinin bulunmamasıdır. Bu buluşun konusu, bu soruna çözüm bulmak üzere hazırlanmış, BstEII ve HaeIII enzimleri ile kesilerek elde edilen parçaların boylarının kolayca yorumlanmasını sağlayan molekül boyu belirleyicileridir. Buluş konusu molekül boyu belirleyicileri, mikobakteri türlerinin saptanmasında kullanılan yöntemin elektroforez aşamasında DNA parçalarının boylarının doğru ve kolay ölçülmesini sağlamaktadır. Moleküler mikrobiyoloji konusu içinde değerlendirilebilecek olan bu ürünlerin bir hastalık tanısı konması ile ilgisi yoktur.

Mikobakteriler arasında en önemli enfeksiyon etkeni *Mycobacterium tuberculosis* bakterisini dünyada yaklaşık iki milyar kişi taşımaktadır. Her yıl on milyon kişi bu bakterinin neden olduğu tüberküloz hastalığına yakalanmakta ve üç milyon kişi bu hastalıktan ölmektedir. Tüberkülozlu hastaların erken saptanması ve uygun tedavisi, bulaşma zincirinin kırılması ve tüberkülozun kontrolü açısından yaşamsal önem taşır. Etkin bir tedavi yapılabilmesinde hastalardan elde edilen mikobakterilerin tiplendirilmesi ve antitüberküloz ilaçlara duyarlılıklarının belirlenmesi çok önemlidir.

Mycobacterium tuberculosis, tüberküloz olgularının büyük çoğunluğundan sorumlu olmasına karşın, birçok başka mikobakteri türü insanda enfeksiyona yol açabilmektedir.

“Atipik mikobakteri” veya “tuberculosis dışı mikobakteri” adı verilen bu bakteriler bağışıklık sistemi başkılanmış hastalarda sıklıkla görülen enfeksiyon etkenleri arasında yer alır. Çevrede (çeşme suyu dahil) çok çeşitli mikobakteri türleri bulunur ve hastalık tanısı için yapılan kültürleri kontamine edebilirler. Kültürlerde mikobakteri ürediği zaman türünün saptanması iki ana nedenden dolayı önem taşır. Öncelikle üreyen türün patojen olup olmadığının belirlenmesine olanak verir. Ancak daha önemlisi tedavide kullanılacak olan ilaç rejiminin doğru belirlenmesini sağlar. M. tuberculosis’e etkili ilaçlar çoğu kez başka mikobakterilere etkili değildir ve tedavi başka ilaçlar gerektirir.

Birçok mikobakteri türü üremek için haftalar gerektirdiğinden, üreme hızı, koloni morfolojisi, karanlık ve aydınlıkta pigment oluşturma ve çeşitli biyokimyasal testlerin değerlendirildiği klasik kültür yöntemlerine dayalı tiplendirme de haftalar, hatta aylar alabilmektedir. Bu kadar uzun sürmesine karşın kültüre dayalı tiplendirme çoğu kez mikobakteri tür isminin tam olarak konmasında yetersiz kalmaktadır. Bu nedenlerden dolayı tür saptamasını daha kesin ve daha kısa sürede saptayacak moleküler tanı yöntemleri geliştirilmiştir.

Mevcut moleküler kitler, mikobakterilerden çoğaltılmış nükleik asitlerin özgül proplar ile tanınması esasına dayanmaktadır. Bunlar her bir türün belirlenmesi için ayrı bir özgül prop ve deney gerektirdiği için hem uygulaması çok emek gerektirmekte hem de maliyeti yüksek olmaktadır. Bu nedenle bunlar sadece birkaç türün saptanması ile sınırlı kalmaktadır.

Hsp65 PCR-REA yöntemi kültürde üretilmiş mikobakterilerden hatta (yeterince mikobakteri varsa) doğrudan hasta örneklerinden türün tam olarak kısa sürede saptanmasını sağlamaktadır. Hsp65 geni tüm mikobakterilerde bulunmakla birlikte bir türden diğerine DNA dizi farklılıkları göstermektedir. Bu farklılıklar özgül DNA dizilerini tanıyıp DNA’yı bu noktalardan kesen restriksiyon enzimleri ile ortaya çıkartılmaktadır.

Bu yöntemde Hsp65 geninin 441 bazçiftlik bir kısmı önce PCR ile mikobakteriden çoğaltılır. Çoğaltma ürünü iki tüpe paylaştırılır. BstE II ve Hae III restriksiyon enzimleri ile ayrı ayrı kesilir. Kesim sonucu elde edilen DNA parçaları elektroforezle molekül ağırlık standartları eşliğinde ayrıştırılarak incelenir. Elde edilen parçaların büyüklükleri, molekül ağırlık standartlarındaki büyüklükleri bilinen DNA molekülleri ile kıyaslanarak belirlenir.

Buluş konusu molekül boyu belirleyicileri, restriksiyon kesimlerinden gelmesi olası olan tüm parçalarla tam aynı büyüklükte parçalar içermekte, böylece karşılaştırma işlemini çok kolaylaştırmaktadır.

Önceki ürünler (moleküler boy belirleyicileri):

Moleküler biyolojide, elektroforez, makromoleküllerin boylarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde gözenekler oluşturan bir jel içerisinde elektrik yüklü moleküller, elektrik gerilimi uygulanarak yürütülürler. Bu sırada moleküller 5 büyüklüklerine göre gözeneklerden geçerken karşılaştıkları dirence göre farklı hızlarda ilerlerler. DNA molekülleri için bu hız boylarının logaritması ile ters orantılıdır. Elektroforez ile ayrıştırılan DNA parçalarının boyları, aynı jelde yürütülen ve içerdiği DNA parçalarının boyları önceden bilinen, molekül boyu belirleyicileri ile karşılaştırılarak saptanır. İncelenen DNA parçalarının boylarının doğru belirlenebilmesi için moleküler boy 10 belirleyicilerinin bu parçalara mümkün olduğunca yakın boylarda, ideal olarak da aynı boylarda parçalar içermesi gerekmektedir.

Mikobakterilerin türlerinin belirlenebilmesi için polimeraz zincirleme tepkimesi (polymerase chain reaction –PCR-) ile çoğaltılan hsp65 geninin 441 bazçiftlik bölümünün BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen parçaların elektroforezle incelenmesi 15 sırasında bugüne dek kullanılan molekül boy belirleyicileri doğru ve kolay ölçüm yapabilme olanağını sağlamaktan uzaktır.

Molekül boy belirleyicileri çoğunlukla kolay üretilen ve kromozomları küçük bakteriyofaj (bakteri virüsü) DNA'larının restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucunda elde edilir. Mikobakteri türlerinin saptanmasında hsp65 geninin PCR ile çoğaltılması ve restriksiyon 20 enzim analizi (REA) ile incelenmesinde en sık olarak E. coli'de çoğaltılan Φ X174 bakteriyofaj DNA'sının HaeIII restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucunda elde edilen molekül boyu belirleyicisi kullanılmıştır. Bu boy belirleyici 1352, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bazçift boylarında toplam 11 adet DNA parçası içermektedir. Mikobakteri türlerinin belirlenmesinde kullanılan PCR-REA yönteminde, genellikle 50-200 25 bazçift boy aralığında molekül boyları birbirine yakın, çok sayıda DNA parçası ortaya çıkmaktadır. Φ X174/HaeIII molekül boyu belirleyicisinde bu aralıkta az sayıda DNA parçası bulunduğundan, incelenen parçaların boylarının tam olarak ölçülmesinde yetersiz kalmaktadır. Daha az kullanılmakla beraber Φ X174/HinfI molekül boy belirleyicisi bu aralıkta nispeten daha fazla sayıda DNA parçası içermekle birlikte bu parçaların boyları 30 mikobakteri tiplendirilmesinde ortaya çıkan bantlardan farklıdır. Φ X174/HinfI 726, 713, 553, 500, 427, 417, 413, 311, 249, 200, 151, 140, 118, 100, 82, 66, 48, 42, 40 ve 24 bazçift uzunluğunda parçalar içermektedir.

DNA parçalarının elektroforezdeki hızlarının temel belirleyicisi boyları olmasına karşın nükleotit içerikleri de (GC/AT oranı) bir miktar hızı etkilemektedir. Mikobakteri DNA'larının GC/AT oranı moleküler boy belirleyicilerin hazırlanmasında kullanılan bakteriyofaj DNA'larından oldukça farklıdır. Bu durum elektroforez ile karşılaştırmada mikobakteri DNA parçalarının boylarının yorumlanmasında yanılgılara yol açabilmektedir.

Buluş konusunun amacı:

Bu buluşun amacı, mikobakterilerin türlerinin belirlenebilmesi için PCR ile çoğaltılan hsp65 geninin 441 bazçiftlik bölümünün BstEII ve HaeIII restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen parçaların elektroforezle incelenerek boylarının belirlenmesini doğru ve kolay bir şekilde yapılmasını sağlayacak molekül boyu belirleyicilerinin eldesidir. Elde edilen iki ürün Marker-B ve Marker-H olarak kısaca isimlendirilmiş olup, bilinen ürünlerden farklı olarak Marker-B 441, 325, 231, 210, 131, 116, 94 ve 79 bazçift boylarında 8 çeşit DNA molekülü içermektedir (Resim 1).

Marker-H 185, 161, 152, 139, 127, 103, 87, 69, 59, 58, 42, 40, 36, 34 olmak üzere 14 çeşit DNA molekülü içermektedir (Resim 2).

Resim 1'de Marker B ve çeşitli mikobakteri türlerinin hsp65 genlerinin PCR ile çoğaltılıp BstEII enzimi ile kesilerek elde edilmiş parçalarının %6 poliakrilamid jelde elektroforez ile ayrıştırıldıklarında oluşturdıkları bantlar gösterilmiştir.

Resim 2'de Marker H ve çeşitli mikobakteri türlerinin hsp65 genlerinin PCR ile çoğaltılıp Hae III enzimi ile kesilerek elde edilmiş parçalarının %8 poliakrilamid jelde elektroforez ile ayrıştırıldıklarında oluşturdıkları bantlar gösterilmiştir.

Buluş konusunun açıklaması:

Molekül boyu belirleyicilerin elde edilmesi:

Marker-B'nin hazırlanması için *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. gallinarum*, *M. intracellulare*, *M. terrae*; Marker-H hazırlanması için ise *M. tuberculosis*, *M. simiae*, *M. gallinarum*, *M. chitae*, *M. xenopi* kullanıldı.

Mikobakterilerden DNA elde edilmesi:

Bakterilerden DNA izolasyonu için, taze kültürde üretilmiş bakteri kolonileri TE (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA) tamponu içerisinde süspansiyon haline getirildi. Santrifüjle 12000g'de 1 dakika çevrilerek çöktürüldü ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Aynı işlem iki kez daha tekrarlanarak bakteriler yıkandı. En sonunda elde edilen bakteri çökeltisi üzerine 250µl TE tamponu konarak tekrar süspansiyon haline getirildi. Tüpler kaynar su banyosunda 20 dakika

bekletildi. Tekrar santrifüj edilerek hücre artıkları çöktürüldü. DNA'yı içeren üst sıvı temiz bir tüpe aktarıldı ve hsp65 genlerinin PCR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı.

PCR ile hsp65 geninin çoğaltılması:

- 5 Mikobakterilerden elde edilen kalıp DNA'lar, taq polimeraz enzimi, deoksinükleotit trifosfatlar, uygun tampon çözelti ve TB11 (5' ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT 3'), TB12 (5' CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT 3') primerleri ile uygun oranda karıştırıldı. Tüpler sıcaklık döngü cihazına yerleştirilerek önce 94°C'da 5 dakika denatürasyon için tutulduktan sonra, 95°C'da 30 saniye denatürasyon, 54°C'da 45 saniye bağlanma ve 72°C'da 90 saniye polimerizasyon olmak üzere 40. döngü yapıldı. En sona eksik kalan zincirleri 10 tamamlamak için 72°C'da 10 dakika bekletme eklendi.

DNA çoğaltma ürünlerinin saflaştırılması:

- 15 Mikobakteri DNA'larında PCR ile çoğaltılan hsp65 geninin 441 bazçiftlik bölgeleri %1'lik agaroz jelde elektroforezle ayrıştırıldı ve etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışığında görünür hale getirildi. Bu ürünleri içeren bantlar kesilerek jelden çıkartıldı. Jel sodyum iyodür çözeltisi ile ısıtılarak eritildi ve DNA'lar cam tozuna bağlanarak çöktürüldü. Birkaç kez yıkandıktan sonra steril deiyonize su ile DNA moleküllerinin camdan ayrılması sağlandı.

Moleküler klonlama:

- 20 Moleküler klonlama amacı ile "pGEM-T easy" PCR ürünlerini klonlama vektörü kullanıldı. Saflaştırılan hsp65 gen bölgeleri pGEM-T easy plazmid vektörü ile bir araya kondu. Ligaz enzimi, uygun tampon ve ATP eklenerek hsp65 genlerinin pGEM-T easy plazmidine bağlanması sağlandı. Elde edilen klonlanmış plazmidler ile daha önceden kompetan hale getirilmiş E. coli JM109 hücreleri transforme edildi. Transforme bakteriler, kültürle çoğaltıldı ve gerektiğinde kullanılmak üzere stokları yapılarak -85°C'de donduruldu.

Plazmid izolasyonu:

- 25 Stok bakterilerden taze kültür hazırlandı. Sıvı besiyerinde bir gece üretilen bakteriler plazmid izolasyonu için kullanıldı. Plazmidler alkali lizis yöntemiyle saflaştırıldı. Bu amaçla, glukoz-tris-EDTA çözeltisinde süspansiyon haline getirilen bakteriler, NaOH-SDS çözeltisi ile parçalandı. Hücre duvarı, proteinler ve kromozomal DNA'lar potasyum asetat çözeltisi ile çöktürüldü. Üst sıvıdaki plazmid RNA karışımı temiz bir tüpe aktarıldı. RNA'lar 30 RNaz enzimi eklenerek parçalandı.

Molekül boyu belirleyicilerinin hazırlanması:

Saflaştırılan, hsp65 geni klonlanmış plazmidler kalıp DNA olarak kullanılarak yukarıda anlatıldığı şekilde PCR ile 441 bazçiftlik bölge çoğaltıldı. Marker-B için M. simiae, M.

smegmatis, *M. gallinarum*, *M. intracellulare*, *M. terrae*'den klonlanmış hsp65 geni çoğaltma ürünleri bir tüpte BstEII enzimi ve uygun tamponu ile karıştırıldı ve 60°C'de bir gün bekletildi. Marker-H hazırlanması için ise *M. tuberculosis*, *M. simiae*, *M. gallinarum*, *M. chitae*, *M. xenopi*'den klonlanmış hsp65 geni çoğaltma ürünleri bir tüpte HaeIII enzimi ve
5 uygun tamponu ile karıştırıldı ve 37°C'de bir gün bekletildi. Elde edilen kesim ürünlerine jel yükleme tamponu eklenerek elektroforeze hazır hale getirildi. Bu şekilde elde edilen Marker-B yorumlamada yardımcı olan 441, 325, 231, 210, 131, 116, 94 ve 79 bazçift boylarında 8 çeşit (Resim A), Marker-H ise 185, 161, 152, 139, 127, 103, 87, 69, 59, 58, 42, 40, 36, 34 olmak üzere 14 çeşit (Resim B) DNA molekülü içermektedir.

10

İSTEMLER

- 1- Bir molekül boyu belirleyicisi olup, ürünün özelliği 441, 325, 231, 210, 131, 116, 94 ve 79 baz çift uzunluğunda DNA molekülüleri içermesidir (Marker-B, Resim 1).
- 2- İstem 1'de belirtilen molekül boyu belirleyicisinin üretim prosesi mikobakterilerden DNA elde edilmesi, PCR ile hsp65 geninin çoğaltılması, DNA çoğaltma ürünlerinin saflaştırılması, moleküler klonlama, plazmid izolasyonu, restriksiyon enzim kesimi ve molekül boyu belirleyicilerinin hazırlanmasından ibarettir.
- 3- İstem 1'de belirtilen molekül boyu belirleyicisinin hazırlanması için kullanılan mikobakteriler, istenen boyda restriksiyon kesim parçalarını oluşturacak mikobakteri türleridir.
- 4- İstem 3'de belirtilen molekül boyu belirleyicisinin hazırlanması için kullanılan bakteri türleri *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. gallinarum*, *M. intracellulare*, *M. terrae*'dir.
- 5- İstem 2'de belirtilen hsp65 geninin PCR ile çoğaltılması işleminde TB11 (5' ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT 3'), TB12 (5' CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT 3') primerleri kullanılır.
- 6- İstem 2'de kullanılan restriksiyon enzimi BstEII'dir.
- 7- İstem 1'de belirtilen molekül boyu belirleyicisi, mikobakteri türlerinin tanımlanmasında kullanılan hsp65 PCR-REA yönteminin elektroforez aşamasında BstEII restriksiyon enzim kesimi sonucunda elde edilen DNA parça boylarının belirlenmesinde kullanılır.
- 8- Bir molekül boyu belirleyicisi olup, ürünün özelliği 185, 161, 152, 139, 127, 103, 87, 69, 59, 58, 42, 40, 36, 34 baz çift uzunluğunda, DNA molekülüleri içermesidir (Marker-H, Resim 2).
- 9- İstem 8'de belirtilen molekül boyu belirleyicisinin üretim prosesi mikobakterilerden DNA elde edilmesi, PCR ile hsp65 geninin çoğaltılması, DNA çoğaltma ürünlerinin saflaştırılması, moleküler klonlama, plazmid izolasyonu, restriksiyon enzim kesimi ve molekül boyu belirleyicilerinin hazırlanmasından ibarettir.
- 10- İstem 8'de belirtilen molekül boyu belirleyicisinin hazırlanması için kullanılan mikobakteriler, istenen boyda restriksiyon kesim parçalarını oluşturacak mikobakteri türleridir.
- 11- İstem 10'da belirtilen molekül boyu belirleyicisinin hazırlanması için kullanılan bakteri türleri *M. tuberculosis*, *M. simiae*, *M. gallinarum*, *M. chitae*, *M. xenopi*'dir.

12- İstem 9'da belirtilen hsp65 geninin PCR ile çoğaltılmasında TB11 (5' ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT 3'), TB12 (5' CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT 3') primerleri kullanılır.

13- İstem 8'de kullanılan restriksiyon enzimi HaeIII'dür.

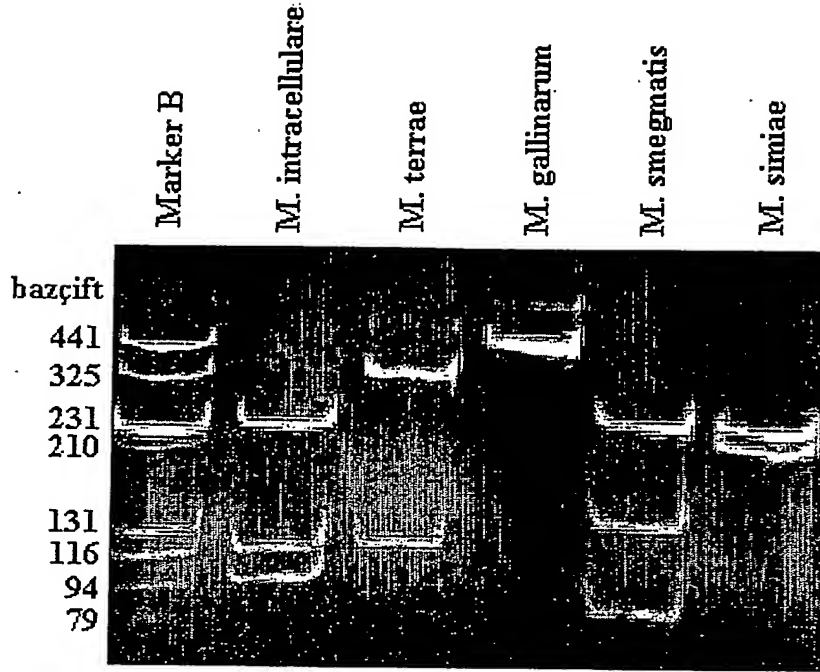
- 5 14- İstem 8'de belirtilen molekül boyu belirleyicisi, mikobakteri türlerinin tanımlanmasında kullanılan hsp65 PCR-REA yönteminin elektroforez aşamasında HaeIII restriksiyon enzim kesimi sonucunda elde edilen DNA parça boylarının belirlenmesinde kullanılır.

10

26.09.2002

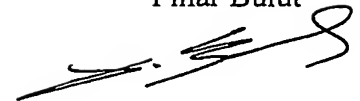
Pınar Bulut

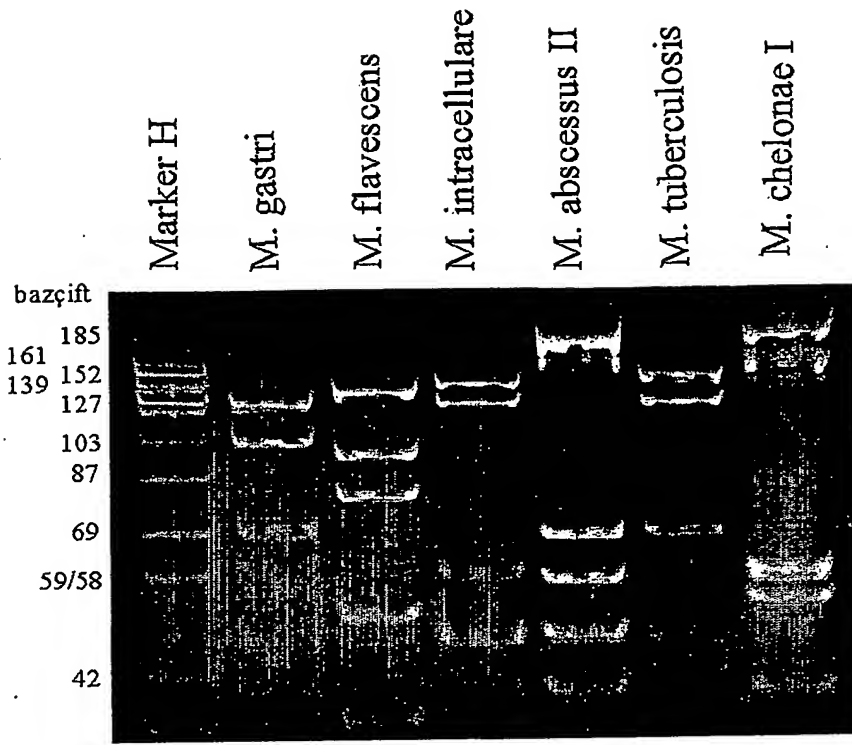




Resim 1

26.09.2002
Pınar Bulut





Resim 2

26.09.2002
Pınar Bulut